

## 特許協力条約

PCT

REC'D 07 APR 2005

WIPO

PGT

特許性に関する国際予備報告（特許協力条約第二章）

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT 36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 PC4362RIK の書類記号	今後の手続きについては、様式PCT/IPEA/416を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP03/16496	国際出願日 (日.月.年) 22.12.2003	優先日 (日.月.年) 26.12.2002
国際特許分類 (IPC) Int.Cl.7 C12N 15/63, C12N 5/10, C07K 2/00		
出願人 (氏名又は名称) 独立行政法人 理化学研究所		

1. この報告書は、PCT 35条に基づきこの国際予備審査機関で作成された国際予備審査報告である。  
法施行規則第57条 (PCT 36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 6 ページからなる。

3. この報告には次の附属物件も添付されている。

a  附属書類は全部で 3 ページである。

補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関が認めた訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面の用紙 (PCT規則70.16及び実施細則第607号参照)

第I欄4. 及び補充欄に示したように、出願時における国際出願の開示の範囲を超えた補正を含むものとこの国際予備審査機関が認定した差替え用紙

b  電子媒体は全部で フレキシブルディスク 1枚 (電子媒体の種類、数を示す)。  
配列表に関する補充欄に示すように、コンピュータ読み取り可能な形式による配列表又は配列表に関連するデータを含む。 (実施細則第802号参照)

4. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- 第I欄 国際予備審査報告の基礎
- 第II欄 優先権
- 第III欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- 第IV欄 発明の單一性の欠如
- 第V欄 PCT 35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- 第VI欄 ある種の引用文献
- 第VII欄 国際出願の不備
- 第VIII欄 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 30.07.2004	国際予備審査報告を作成した日 16.03.2005
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 田中 晴絵 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## 第I欄 報告の基礎

1. この国際予備審査報告は、下記に示す場合を除くほか、国際出願の言語を基礎とした。

この報告は、\_\_\_\_\_語による翻訳文を基礎とした。  
それは、次の目的で提出された翻訳文の言語である。

PCT規則12.3及び23.1(b)にいう国際調査  
 PCT規則12.4にいう国際公開  
 PCT規則55.2又は55.3にいう国際予備審査

2. この報告は下記の出願書類を基礎とした。（法第6条（PCT14条）の規定に基づく命令に応答するために提出された差替え用紙は、この報告において「出願時」とし、この報告に添付していない。）

出願時の国際出願書類

明細書

第 1-17 ページ、出願時に提出されたもの  
第 \_\_\_\_\_ ページ\*、 \_\_\_\_\_ 付けで国際予備審査機関が受理したもの  
第 \_\_\_\_\_ ページ\*、 \_\_\_\_\_ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

請求の範囲

第 2, 4-8, 10-16 項、出願時に提出されたもの  
第 \_\_\_\_\_ 項\*、PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
第 1, 9 項\*、08.11.2004 付けで国際予備審査機関が受理したもの  
第 \_\_\_\_\_ 項\*、 \_\_\_\_\_ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

図面

第 1-5 ページ/図、出願時に提出されたもの  
第 \_\_\_\_\_ ページ/図\*、 \_\_\_\_\_ 付けで国際予備審査機関が受理したもの  
第 \_\_\_\_\_ ページ/図\*、 \_\_\_\_\_ 付けで国際予備審査機関が受理したもの

配列表又は関連するテーブル

配列表に関する補充欄を参照すること。

3.  振正により、下記の書類が削除された。

<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____	ページ _____
<input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲	第 3	項 _____
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____	ページ/図 _____
<input type="checkbox"/> 配列表（具体的に記載すること）		
<input type="checkbox"/> 配列表に関するテーブル（具体的に記載すること）		

4.  この報告は、補充欄に示したように、この報告に添付されかつ以下に示した振正が出願時における開示の範囲を超えてされたものと認められるので、その振正がされなかったものとして作成した。（PCT規則70.2(c)）

<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____	ページ _____
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項 _____
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____	ページ/図 _____
<input type="checkbox"/> 配列表（具体的に記載すること）		
<input type="checkbox"/> 配列表に関するテーブル（具体的に記載すること）		

\* 4. に該当する場合、その用紙に "superseded" と記入されることがある。

## 第三欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

国際出願全体

請求の範囲 12-16、及び請求の範囲 1,2,4-11 のうち DT40 細胞に関連する部分以外

理由：

この国際出願又は請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、国際予備審査をすることを要しない  
次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 \_\_\_\_\_ の  
記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

全部の請求の範囲又は請求の範囲 \_\_\_\_\_ が、明細書による十分な  
裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

請求の範囲 12-16、及び請求の範囲 1,2,4-11 のうち DT40 細胞に関連する部分以外 について、国際調査報告が作成されていない。

ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が、実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を、次の点で満たしていない。

書面による配列表が

提出されていない。  
 所定の基準を満たしていない。  
 提出されていない。  
 所定の基準を満たしていない。

コンピュータ読み取り可能な形式による配列表が

コンピュータ読み取り可能な形式によるヌクレオチド又はアミノ酸の配列表に関するテーブルが、実施細則の附属書Cの2に定める技術的な要件を、次の点で満たしていない。

提出されていない。  
 所定の技術的な要件を満たしていない。

詳細については補充欄を参照すること。

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲 2, 4-11 請求の範囲 1	有無
進歩性 (I S)	請求の範囲 1, 2, 4-11	有無
産業上の利用可能性 (I A)	請求の範囲 1, 2, 4-11 請求の範囲	有無

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献 1:NICKOLOFF,J.A., Mol.Cell.Biol., (1992), Vol.12, No.12, pp.5311-5318  
 文献 2:BUERSTEDDE,J. and TAKEDA,S., Cell, (1991), Vol.67, No.1, pp.179-188  
 文献 4:LAHTI,J.M., Methods, (1999), Vol.17, No.4, pp.305-312  
 文献 5:SLEBOS,R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., (2001), Vol.281, No.1, pp.212-219  
 (以下、国際予備審査段階で新たに発見された文献)  
 文献 3:PHI-VAN,L. and Stratling,W.H., Biochemistry, (1996), Vol.35, No.33, pp.10735-10742  
 文献 6:BULFONE-PAUS,S. et al., Nucleic Acids Res., (1995), Vol.23, No.11, pp.1997-2005  
 文献 7:LAUSTER,R., et al., EMBO J., (1993), Vol.12, No.12, pp.4615-4623  
 文献 8:ISRAEL,I.D., Nucleic Acids Res., (1989), Vol.17, No.12, pp.4589-4595

文献 1 には、CHO Cell 等の動物細胞の染色体に組込んだ、DEX(dexamethasone)応答性MMTVプロモーターで転写を制御した neo 等の遺伝子と、それとは別の neo 等の遺伝子との間での相同組換えにおいて、前記 DEX 応答性 MMTV プロモーターからの転写を活性化することで、相同組換えの効率を向上させるという、動物細胞の相同組換えを誘発する方法が記載されている。

文献 2 には、細胞に導入した  $\beta$ -Actin 等の遺伝子に相同性の高い配列を有する DNA と、前記細胞の染色体上の  $\beta$ -Actin 等の遺伝子との相同組換え (Targeted Integration) が起きる頻度(targeted/total integration)を測定する系において、細胞として DT-40 を用いると、他の細胞を用いたときよりも、相同組換えの頻度 (効率) が高いことが記載されている (Table.1 参照)。

文献 3 には、ニワトリのライソザイム遺伝子近傍の MAR (5'MAR) が記載されており、エンハンサー及びプロモーターに連結した CAT 等の構造遺伝子を有する DNA (以下、発現単位という) を染色体に挿入し、前記 CAT 等の構造遺伝子を発現させる系において、前記 5'MAR を、前記発現単位の近傍に挿入することにより、染色体に組込む構造遺伝子の発現を向上させる方法が記載されている (Fig.1, Table.1 参照)。

文献 4 には、DT-40 細胞等の動物細胞において、テトラサイクリン応答型プロモータを用いて、遺伝子の転写を制御する方法が記載されている。

文献 5 には、EBFP(EGFP の 66 番目のアミノ酸を Tyr に代えた変異体) の遺伝子と、当該 EBFP の遺伝子と類似する塩基配列を有する EGFP の誘導体 (GFP と EGFP の融合タンパク質) の遺伝子を、DT-40 等の動物細胞に導入し相同組換えを行なったことが記載されている。

文献 6-7 には、ニワトリのイムノグロブリン軽鎖の 3' エンハンサーが記載されている。

文献 8 には、MMTV のプロモーター近傍に存在する、GRE(glucocorticoid responsive element) という、MMTV のエンハンサー領域が記載されている。

## 配列表に関する補充欄

## 第I欄2. の続き

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際予備報告を作成した。

a. タイプ  配列表  
 配列表に関するテーブル

b. フォーマット  書面  
 コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期  出願時の国際出願に含まれる  
 この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された  
 出願後に、調査又は予備審査のために、この国際機関に提出された  
 \_\_\_\_\_ 付けで、この国際予備審査機関が補正\*として受理した

2.  さらに、配列表又は配列表に関するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

\*第I欄4. に該当する場合、差替える配列表又は配列表に関するテーブルに "superseded" と記入されることがある。

## 補充欄

いざれかの欄の大きさが足りない場合

## 第 V 欄の続き

請求の範囲 1 に記載の発明は、文献 1 より新規性及び進歩性を有さない。

請求の範囲 1 に記載の発明と、文献 1 に記載の発明の、遺伝子、該遺伝子と類似する塩基配列、転写プロモーターの配置は、文言上区別し得ないし、文献 1 に記載の発明において、転写制御する遺伝子の 5'側上流にもう一方の遺伝子を配置することも、当業者には容易である。

請求の範囲 2,4-7 に記載の発明は、文献 1 と文献 2 より進歩性を有さない。

文献 1 に記載の DEX 応答性 MMTV プロモーターは、DEX を添加することで、プロモーターからの転写が活性化されるので、GRE という MMTV のエンハンサー領域を含んでいると認める（文献 8 参照）。

さらに、文献 1 に記載の相同組換えを誘発する方法に用いる動物細胞として、例えば文献 2 に記載の DT-40 細胞を用いることは、当業者には容易である。

請求の範囲 4-7 に記載の発明は、文献 1-2 と文献 3 により進歩性を有さない。

文献 1 に記載の相同組換えを誘発する方法は、相同組換え効率を向上させるために、染色体に組込んだ遺伝子からの転写の活性化を行なうところ、同じく染色体に遺伝子を組込んだ際に、当該遺伝子の発現を活性化させるため、ニワトリの 5'MAR を、染色体に組込む遺伝子を含む発現単位の近傍に挿入する方法は、文献 3 に記載の通り公知である。

したがって、文献 1-2 に基づいた DT-40 細胞を用いた相同組換えを誘発する方法において、遺伝子及び DEX 応答性 MMTV プロモーターを含む発現単位の近傍に、文献 3 に記載のニワトリの 5'MAR を挿入することは、当業者には容易である。

請求の範囲 8,11 に記載の発明は、文献 1-3 と文献 4 と文献 6-7 とにより進歩性を有さない。

文献 1-3 に基づいた、相同組換えを誘発する方法において、DEX 応答性 MMTV プロモーターに代えて、例えば文献 4 に記載の、当業者にとって周知のテトラサイクリン応答型プロモーターを用いることや、さらに、例えば文献 6-7 に記載の、当業者にとって周知のニワトリの 3'エンハンサーを用いてみるとことは当業者には容易である。

請求の範囲 9-11 に記載の発明は、文献 1-4,6-7 と文献 5 により進歩性を有さない。

文献 1-4,6-7 に基づいた、相同組換えを誘発する方法において、文献 5 に記載の、EBFP と EGFP の誘導体の相同組換えを行うこと、そしてその際に、当業者にとって周知の、EGFP と、EGFP と相同性を有する ECFP を、相同組換えを行なう遺伝子として用いてみるとことは当業者には容易である。

## 請求の範囲

1. (補正後) 任意の遺伝子座において DNA 相同組換えが起きている真核生物細胞の体細胞相同組換えを誘発する方法であつて、該遺伝子座の遺伝子の転写制御のための転写プロモーターを、該遺伝子の塩基配列と類似する塩基配列の下流 3' 側に配置し、該遺伝子と作用可能に隣接することによって該遺伝子の転写を制御し、該遺伝子の塩基配列と該遺伝子と類似する塩基配列との間で DNA 相同組換えを誘発することを特徴とする体細胞相同組換えの誘発方法。

2. 前記細胞が DT40 細胞であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

3. (削除)

4. 前記転写制御のためのシスに作用する領域が、エンハンサー、核マトリックス結合領域 (MAR) のいずれか一つ又は両方を含むことを特徴とする請求項 1 ないし 3 のいずれか一項に記載の方法。

5. 前記遺伝子及び前記遺伝子と類似する塩基配列が外来性である場合、

(a) 該遺伝子に類似する塩基配列、転写プロモーター及び該遺伝子のベクター上における順番が、5' 側から該遺伝子と類似する塩基配列、転写プロモーター、該遺伝子の順番であつて、該転写プロモーターが該遺伝子と作用可能となるように挿入する段階、

(b) 該ベクターを細胞内へ導入して、該遺伝子に類似する塩基配列、転写プロモーター及び該遺伝子を染色体上に組込む段階、を含むことを特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれか一項に記載の

方法。

6. 前記ベクター上にエンハンサー、核マトリックス結合領域（MAR）のいずれか一つ又は両方を前記転写プロモーターに対して作用可能に挿入することを特徴とする請求項5に記載の方法。

7. 前記転写プロモーターが誘導的プロモーターであることを特徴とする請求項5又は6に記載の方法。

8. 前記誘導的プロモーターがテトラサイクリン誘導プロモーターであることを特徴とする請求項7に記載の方法。

9. (補正後) 前記遺伝子が強化青緑色蛍光タンパク質（EGFP）遺伝子であることを特徴とする請求項5ないし8のいずれか一項に記載の方法。

10. 前記遺伝子と類似する塩基配列が強化緑色蛍光タンパク質（EGFP）遺伝子配列であることを特徴とする請求項5ないし9のいずれか一項に記載の方法。

11. 前記エンハンサーがニワトリ抗体軽鎖遺伝子エンハンサー（3' enhancer）であって、前記核マトリックス結合領域（MAR）がニワトリ由来であることを特徴とする請求項4ないし10のいずれか一項に記載の方法。

12. 請求項1ないし11のいずれか一項に記載の方法により、DNA相同組換えが誘発される細胞。

13. 請求項1ないし11のいずれか一項に記載の方法によ

り、相同組換えが誘発される遺伝子。

14. 請求項13に記載の相同組換えが誘発される遺伝子によってコードされるタンパク質。

15. 相同組換えを誘発する遺伝子及び該遺伝子の転写制御のための転写プロモーターが配置されたベクターにおいて、該転写プロモーターの5'側上流域に該遺伝子に類似する塩基配列が配置され、該遺伝子の相同組換えを誘発するために構築されるベクター。

16. エンハンサー、核マトリックス結合領域（M A R）のいずれか一つまたは両方をさらに作用可能に挿入した請求項15に記載のベクター。